

深层培养白僵菌生产工艺初步试验

黑龙江省青冈县微生物农药厂

黑龙江省应用微生物研究所白僵菌组(哈尔滨)

以菌治虫前途广阔

白僵菌属于半知菌纲、丛梗孢目、丛梗孢科、白僵菌属，广布于欧、亚、澳、非、南北美洲。该属有二个种，即球孢白僵菌和卵孢白僵菌，其它皆系同种异名，这两个种在我国皆有分布。

白僵菌可以寄生在16个科的幼虫、蛹及成虫上，其中，球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)能寄生在63种虫体上。在我国应用白僵菌防治农林害虫，经大量试验证明是有效的。

有关单位在松毛虫、玉米螟虫发生地区使用白僵菌，其防治效果达80%以上。在农田，可以挽回玉米收成的1/10。近年来，尤其是无

产阶级文化大革命以来，白僵菌的施用面积逐年增加，应用范围逐步扩大。

但是，直到目前为止，农林业生产中使用的白僵菌制剂都是用固体方法生产的。

为了使白僵菌制剂的生产实现工业化，使它在防治农、林害虫中发挥更大的作用，我们研究了白僵菌深层发酵生产工艺。

通过实验室及田间试验，我们探索到以豆制品加工废水——黄浆水为原料，用深层培养法生产白僵菌的途径。并经500升发酵罐中间放大试验，确定了适于工业化生产的工艺条件。

生 产 工 艺

一、一级斜面菌种

从中国科学院微生物研究所引进球孢白僵菌3.4273原种。经虫体或昆虫组织液复壮，保存在马铃薯琼脂培养基上。移接后在26—28℃培养3天，斜面即布满菌丝，5—7天即长出大量乳白色分生孢子，轻

轻敲击管壁，孢子即行脱落。凡菌丝长势不良，孢子量少或气生菌丝较长的为退化现象，即应淘汰。

经试验，用黄浆水，加入2%琼脂做成的斜面，用于白僵菌培养也可得到满意效果。

二、二级液体种子

将斜面菌种(分生孢子)进行丰富培养。培养基为察氏培养基加1.5%蛋白胨，培养72小时，待孢子长成菌丝，形成芽生孢子即可打入生产罐进行深层培养。

三、深层培养

培养液为豆制品厂加工食用豆腐的压榨水(即黄浆水)。黄浆水宜新鲜，久置易变质。其pH5—6.4，波美度1，还原糖含量0.25克/100毫升。培养液使用前需将黄浆水以浓硫酸或浓盐酸调pH至2，通蒸气加热至沸腾，维持10分钟以提高其还原糖和氨基氮含量。然后以氨水或石灰水将pH调至5，按发酵罐有效容积的60%，打入发酵罐内。加底油0.2%，以1公斤/厘米²压力，灭菌30分钟。然后罐内维持0.5公斤/厘米²压力，待发酵液温度降至26—28℃，打入二级种子液。

接种后，罐温控制在26—28℃，罐压维持在0.3公斤/厘米²，搅拌速度为200转/分，通入无菌空气进行发酵。

依各生长阶段对氧的需要量不同，调节通气量：

0—12小时，风量为30*。

13—40小时，风量增至80。

41小时后到发酵终了，风量减至50，此时芽生孢子增多，菌丝量减少，发酵液逐渐变稀，泡沫减少。

发酵过程中流加适量的灭菌豆油，连同底油，总量不超过0.5%。

当发酵进行到60小时后，发酵液已明显变稀，颜色呈淡黄略带白色，此时，仅有少量菌丝，芽生孢子增至9—10亿/毫升以上。为了掌握适宜的放罐时间，应注意检查。当发酵液内芽生孢子无增多趋势，培养液

* 按上海玻璃仪器厂产LF-16型浮子流量计的刻度示数(%)表示。下同。

内还原糖含量降到 0.05 克/100 毫升以下, 即应停止发酵。

四、加填充剂

发酵停止后, 按发酵液总体积的 5% 的用量加入滑石粉 (325 目), 开搅拌机, 并通入空气, 以便使发酵液和滑石粉混匀。

五、常温干燥

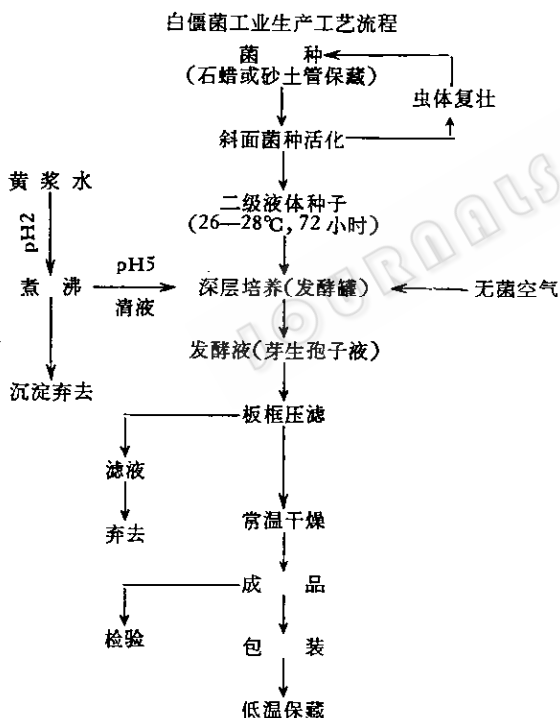
加填充剂后, 进行板框压滤, 最后进行常温干燥, 即得成品。

六、成品质量检查

抽样测定芽生孢子数量 (亿/克), pH, 含水率, 颜色, 溶解度, 发芽率。

试验产品 76201 芽生孢子数 450 亿/克 (平皿计数), pH 4.9, 含水率 < 2%, 粉剂在冷水中浸 12 小时, 芽生孢子全部悬于水中。制剂淡黄色, 具特殊香味。

成品包装后置于 -5—0℃ 环境中保存备用。



发酵过程中白僵菌的变化

在深层培养下, 白僵菌的生长发育始于分生孢子发芽, 菌丝伸长, 菌丝分枝, 终于芽生孢子的形成, 历经 60—72 小时完成一个无性世代。

分生孢子自接入培养液 8 小时开始发芽, 12 小时

全部发芽, 部分芽管开始伸长。继菌丝伸长后, 16 小时菌丝开始分枝, 24 小时出现少量芽生孢子。

发酵 32 小时菌丝大量分枝, 此时菌丝生长达到旺盛阶段, 发酵液较稠, 芽生孢子也大量出现。40—50 小时, 发酵液中菌丝多于芽生孢子, 到 60—72 小时, 镜检可见芽生孢子铺满整个视野。

芽生孢子有二种类型: 一种长椭圆形, $5.2-11.7 \times 2.6-3.9$ 微米; 一种为梨形, 大小为 5.2×2.6 微米。

芽生孢子的形成, 大部分以芽殖方式生成, 到后期见有少量以菌丝断裂方式。

此外, 观察到白僵菌对碳源、氮源的需要量在 20 小时达到最大, 45 小时营养源基本耗尽 (图 1)。在黄浆水为基质时, 在 pH 4—6 之间均可生长, 在碱性条件下, 例如 pH 8, 孢子难以发芽。

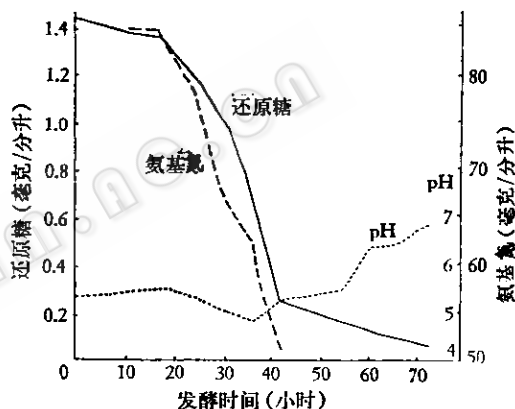


图 1 发酵过程中还原糖、氨基氮及 pH 变化

毒效试验

LD₅₀ 测定: 取以黄浆水为基质, 深层发酵 70 小时白僵菌的产品, 用血球计数板计算每克含芽生孢子数量, 稀释成不同浓度, 以喷雾沉降接触感染昆虫。被试昆虫来自玉米秸越冬的玉米螟幼虫, 将被感染不同剂量组的昆虫, 放到恒温、恒湿箱饲养, 观察 7—10 天, 统计僵虫数目。结果见图 2。

由图 2 可见, LD₅₀ 为 4.169 万个芽生孢子/厘米²。我们认为这个数据比较可信, 因为在预备试验中摸索过最低、最高剂量, 并且按两个剂量的等比级数拟出各组的剂量; 我们又用 5 万芽生孢子/厘米² 相近的剂量, 测定了不同孢子间毒效的比较 (见表 1), 证明也是比较吻合的。

发酵 70 小时的制剂 (芽生孢子) 与分生孢子的毒力基本上一致。而发酵 108 小时, 培养液内还原糖消耗到 0.05 克/100 毫升以下时, 其毒力有明显降低。

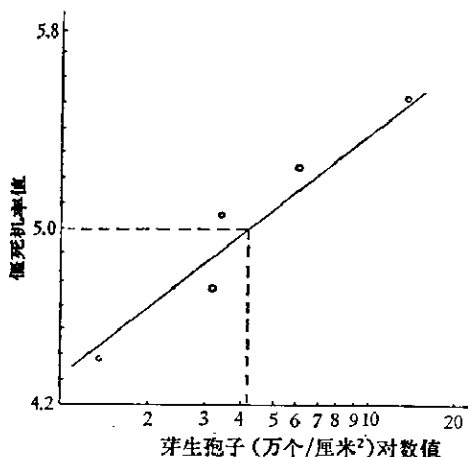


图2 芽生孢子对玉米螟幼虫的 LD_{50} -P 值线

表1 芽生孢子和分生孢子的毒效比较

剂量: 5 万孢子/厘米²

制 剂 类 型	第一次试验			第二次试验			平均僵虫率 (%)
	玉米螟 数	僵虫 数	僵虫 率 (%)	玉米螟 数	僵虫 数	僵虫 率 (%)	
分生孢子	36	11	31	36	19	53	42
发酵 70 小时的芽生孢子	36	17	47	36	23	64	55.5
发酵 108 小时的芽生孢子	36	8	22	36	13	36	29

芽生孢子制剂的保藏

我们用深层发酵生产的白僵菌液, 用碳酸钙或滑

石粉填充, 自然干燥后分别保藏在室温及低温条件下, 供定期测芽生孢子活力用。

以 75601 制剂为例, 每克菌粉中含活孢子 28 亿 (平皿混菌法), 保藏前即测定孢子萌发力, 然后保藏在室温 (15—28℃) 和低温 (-5—0℃) 条件下, 不同时间测定芽生孢子活力。我们采用混菌法平板计数, 结果如下表。

表2 不同保藏方法芽生孢子的萌发力(亿/克)

测 定 时 间	常温(15—28℃)	低温(-5—0℃)
自然干燥后孢子粉	28	28
保藏 8 个月后孢子粉	8	24

由表可见, 芽生孢子经过 8 个月的低温保藏后, 孢子活力未见明显下降。

注 意 事 项

1. 试验证明, 菌种质量与毒效呈正相关。因此, 在生产中必须采用经过复壮的菌种。

2. 虽然获得了实验室良好的杀虫效果, 但是, 由于受季节的限制, 田间杀虫效果还有待进一步试验。

3. 我们试验了几种工业废水, 其中以黄浆水较优, 纸上层析结果证明, 其中含有多多种氨基酸。除黄浆水外, 其他如发酵工业、食品加工工业废水数量很大, 可考虑研究使用。